



Original Article

# EV-A71 Infections: Life Cycle and Prevention Strategies

Tu Quang Long, Nguyen Thanh Tan, Tran Thien Thien,  
Vo Nguyen Hai Vy, Tran Van Hieu\*

*VNUHCM - University of Science,  
227 Nguyen Van Cu, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh, Vietnam*

Received 05 August 2021

Revised 05 September 2021; Accepted 13 October 2021

**Abstract:** Hand, Foot, and Mouth disease (HFMD) is a highly contagious disease caused by enteroviruses, common in Asia-Pacific countries, including Vietnam. Children are more susceptible to infection, especially newborns and children under-5-year-old. HFMD may cause severe symptoms like meningitis, myocarditis, and acute pulmonary edema leading to death if no early detection or prompt treatment is carried out. Various research indicated the main causes of HFMD were enteroviruses in the *Picornaviridae* family, particularly Coxsackievirus A16 (CV-A16) and Enterovirus 71 (EV-A71). Both factors cause the same early symptoms, but while CV-A16's are mild and can be self-recuperated after 10-14 days, EV-A71's are more dangerous and can lead to neurological, cardiovascular, and respiratory complications, causing death or permanent brain damage. Preventing EV-A71 infection is extremely necessary as it not only decreases severe HFMD but also interferes with the complexity of epidemic situations in the world. Therefore, a review of the virus life cycle and prevention strategies against EV-A71 is crucial and essential to provide an overview of the potential methods for vaccines and medicines development or food supplement manufacturers which contributes to preventing EV-A71 infection.

**Keywords:** Hand, Foot, and Mouth disease; Enterovirus 71, EV-A71 life cycle, EV-A71 prevention strategies.

\* Corresponding author.

*E-mail address:* [tvhieu@hcmus.edu.vn](mailto:tvhieu@hcmus.edu.vn)

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5288>

# Con đường xâm nhiễm của EV-A71 và chiến lược ngăn chặn

Từ Quảng Long, Nguyễn Thanh Tấn, Trần Thiên Thiên,  
Võ Nguyễn Hải Vy, Trần Văn Hiếu\*

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh,  
227 Nguyễn Văn Cừ, Phường 4, Quận 5, Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 05 tháng 8 năm 2021

Chỉnh sửa ngày 05 tháng 9 năm 2021; Chấp nhận đăng ngày 13 tháng 10 năm 2021

**Tóm tắt:** Bệnh Tay Chân Miệng (TCM) là bệnh truyền nhiễm gây ra bởi virus, phổ biến trong khu vực Châu Á-Thái Bình Dương, trong đó có Việt Nam. Đối tượng chủ yếu của bệnh là trẻ em dưới 10 tuổi, và đặc biệt nghiêm trọng đối với trẻ sơ sinh và trẻ em dưới năm tuổi. Bệnh có thể gây nhiều biến chứng nguy hiểm như viêm màng não, viêm cơ tim, và viêm phổi. Nếu không được phát hiện và xử trí kịp thời thì nguy cơ tử vong sẽ rất cao và nhanh chóng. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra nguyên nhân của bệnh TCM là do các virus đường ruột thuộc họ *Picornaviridae*, thường là bởi loài Enterovirus A ở người, phổ biến nhất là Coxsackievirus A16 (CV-A16) và Enterovirus 71 (EV-A71). Tuy nhiên, CV-A16 thường gây ra các triệu chứng bệnh TCM nhẹ, ít biến chứng. Trong khi đó, EV-A71 được biết đến là gây ra một loạt các tác động từ nhiễm trùng không có triệu chứng, bệnh TCM nhẹ đến rất nặng với các biến chứng hệ thần kinh trung ương nghiêm trọng, suy tim, phù phổi, có thể dẫn đến tử vong, và những thương tật vĩnh viễn ở trẻ nhỏ. Do tính nghiêm trọng của bệnh TCM gây ra bởi EV-A71, việc ngăn chặn sự xâm nhiễm của EV-A71 không chỉ là cách để phòng ngừa bệnh TCM mà còn là biện pháp tối ưu ngăn chặn sự phức tạp của dịch bệnh trên thế giới. Chính vì vậy, bài tổng quan các thông tin về con đường xâm nhiễm của EV-A71, và các chiến lược để ngăn chặn quá trình này là vô cùng cần thiết; từ đó cung cấp một cái nhìn đầy đủ về các phương pháp tiềm năng trong việc phát triển vaccine, thuốc hoặc các thực phẩm chức năng có khả năng phòng chống sự xâm nhiễm của EV-A71.

**Từ khóa:** Bệnh Tay Chân Miệng, Enterovirus 71, con đường xâm nhiễm EV-A71, chiến lược ngăn chặn EV-A71.

## 1. Mở đầu

### 1.1. Enterovirus 71 (EV-A71)

Enterovirus 71 (EV-A71), một trong những tác nhân gây nên những biến chứng nguy hiểm của bệnh Tay Chân Miệng (TCM), được phân lập lần đầu tiên vào năm 1996 tại California, Mỹ, và nó đã nhanh chóng lây lan ra khắp nơi trên thế giới. Enterovirus 71 (EV-A71) thuộc họ *Picornaviridae*, chi Enterovirus, loài Enterovirus A. Các kiểu gen ở người bao gồm bốn loại A, B, C, D, và được chia nhỏ thành 11 phân nhóm phụ dựa trên sự khác biệt trong vùng gen *vp 1*, riêng

kiểu gen D được phân loại bao gồm các chủng EV-A71 tái tổ hợp kép với CV-A16 [1-3]. Kiểu gen A chỉ có duy nhất một chủng nguyên mẫu (BrCr), trong khi kiểu gen B và C có năm kiểu gen phụ, bao gồm B1 đến B5 và tương ứng C1 đến C5 [4, 5].

Về cấu trúc, hạt virus EV-A71 có đường kính 20-30 nm, không có màng bao bọc, cấu tạo từ bốn loại protein chính là VP1 đến VP4. Bốn loại protein trên tạo nên một protomer, và năm protomer sẽ tạo nên một pentamer, 12 pentamer kết hợp với bộ gen tạo thành cấu trúc hoàn chỉnh của virus (Hình 1 A, B). Tại tiểu phần VP1 có một rãnh lõm gọi là canyon, đây là nơi chứa các vị trí liên kết của virus với thụ thể ở người để bắt đầu quá trình xâm nhiễm [4]. Về bộ gen, EV-A71 chứa sợi RNA đơn (+) với kích thước khoảng

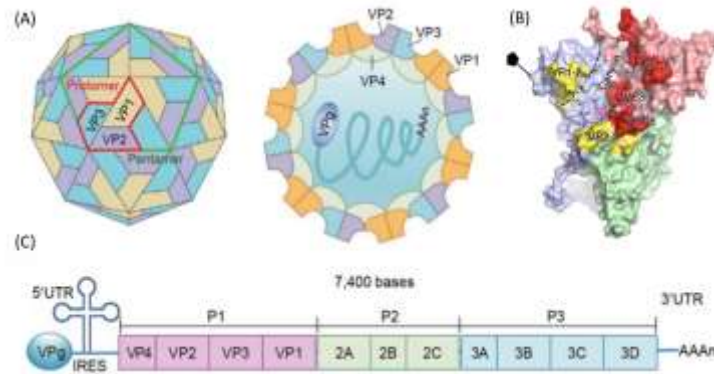
\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: tvhieu@hcmus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5288>

7,5 kb, gồm ba vùng gen chính là P1, P2, P3, và hai vùng gen không được dịch mã (UTR) nằm ở hai đầu 5' và 3'. Vùng P1 mã hóa bốn loại protein tạo vỏ virus, vùng P2 tổng hợp các enzyme hỗ trợ xử lý các protein cấu trúc, vùng P3 tổng hợp enzyme sao chép RNA (RdRP).

Vùng 5'UTR chứa vị trí tiếp nhận ribosome nội bào (IRES), cho phép protein virus được dịch mã trong vùng độc lập với mũ và liên kết cộng hóa trị với VPg (hay protein virus 3 B), và vùng 3' (UTR) bao gồm đuôi poly-A (Hình 1 C).

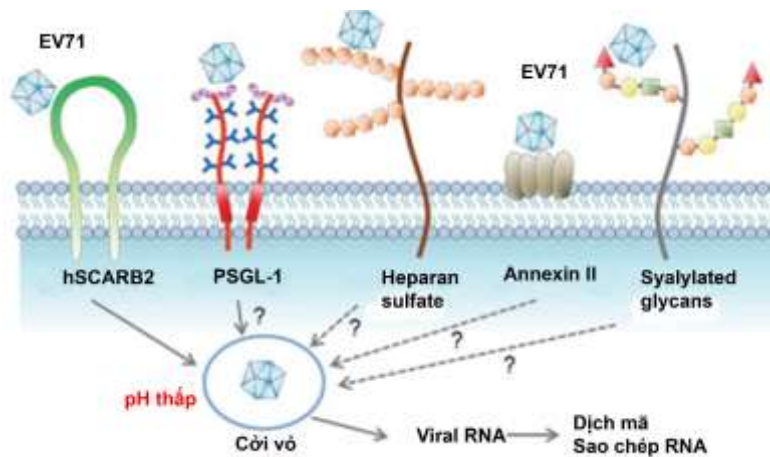


Hình 1 (A). Cấu trúc lớp vỏ virus; (B) Cấu trúc một mặt của virus gồm 3 tiểu phần VP1 (xanh dương), VP2 (xanh lá), VP3 (đỏ); (C) RNA của EV-A71 [6].

1.2. Các thụ thể cho EV-A71 kích hoạt quá trình xâm nhiễm

Việc tiếp xúc của virus với các thụ thể trên tế bào người là quá trình mấu chốt cho sự xâm nhiễm. Nhiều loại thụ thể của virus trên tế bào người đã được nghiên cứu và phân thành hai

nhóm, bao gồm thụ thể xâm nhiễm, điển hình là human scavenger receptor B2 (SCARB2), human P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), và các thụ thể hỗ trợ liên kết như annexin A2 (Anx2), heparan sulfate (HS), sialylated glycan, nucleolin, vimentin, proteoglycan, fibronectin,...



Hình 2. Các thụ thể chính trong việc bám dính và xâm nhập vào tế bào chủ của virus [6].

i) Thụ thể xâm nhiễm  
SCARB2 là một protein xuyên màng kép loại III, có khối lượng phân tử khoảng 55 kDa và bao

gồm 478 amino acid, giữ vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm của EV-A71 [7]. Cấu trúc gồm ba vùng (domain), I, II, và III; trong đó hai

domain I và II đều góp phần hình thành cấu trúc và một kênh lipid xuyên qua thụ thể. Domain III nhỏ hơn với một cụm ba vòng xoắn ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ , và  $\alpha 7$ ) che một đầu của kênh lipid, được biết đến như vùng gắn với EV-A71 [8]. SCARB2 tham gia vào quá trình vận chuyển qua màng, chức năng chính là vận chuyển  $\beta$ -glucocerebrosidase từ lưới nội chất (ER) đến lysosome, như vậy phần lớn thụ thể SCARB2 hiện diện trên màng lysosome, và có một tỷ lệ nhỏ thụ thể được vận chuyển giữa các endosome/lysosome và màng tế bào, nơi chúng hoạt động như thụ thể cho EV-A71 và cả CV-A16 (Hình 2) [9]. Virus khi gắn được với thụ thể SCARB2, sẽ xâm nhập thông qua trung gian clathrin vào các túi endosome/lysosome. Tại đây sự thay đổi cấu trúc thụ thể khi pH môi trường thay đổi gây ra các kích thích lên lớp vỏ virus và kích hoạt quá trình cởi lớp vỏ, giải phóng vật chất di truyền, bắt đầu quá trình xâm nhiễm [8]. SCARB2 hiện diện trên nhiều loại tế bào và mô khác nhau ở người đặc biệt là tế bào thần kinh trong hệ thần kinh trung ương. Do đó SCARB2 còn được cho là trung gian dẫn đến các biến chứng thần kinh nghiêm trọng của bệnh TCM gây ra bởi EV-A71 [10]. Vì vậy, đây là thụ thể cần được quan tâm khi phát triển các chiến lược ngăn chặn sự lây nhiễm của virus.

P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) là một protein màng tế bào bạch cầu sialomucin, đóng vai trò quan trọng trong việc bám và di chuyển của bạch cầu trên thành mạch đến các vị trí viêm do nhiễm trùng [11]. Nishimura và cộng sự đã chứng minh PSGL-1 là một trong những thụ thể xâm nhiễm quan trọng của EV-A71 (Hình 2) [12, 13]. Tuy nhiên khác với SCARB2, PSGL-1 không phải là thụ thể chung cho tất cả các chủng EV-A71, và hiệu quả lây nhiễm qua trung gian PSGL-1 thấp hơn nhiều so với trung gian SCARB2. Tuy vậy, PSGL-1 thúc đẩy sự nhân lên của EV-A71 và mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng ở giai đoạn sớm [14]. Nói cách khác, PSGL-1 có thể tăng cường sự lây nhiễm EV-A71, nhưng không đóng một vai trò quan trọng trong bệnh sinh của EV-A71;

ii) Các thụ thể liên kết

Annexin II (Anx2) được tạo thành từ lõi xoắn  $\alpha$  liên kết các ion canxi, cho phép chúng

tương tác với màng phospholipid [15]. Yang và các cộng sự [16] đã chứng minh Anx2 trên bề mặt tế bào có thể liên kết với tiểu phần VP1 trên lớp vỏ virus (Hình 2), và tương tác của nó khá phổ biến đối với các chủng EV-A71 phân lập lâm sàng. Anx2 có thể gia tăng mức độ xâm nhiễm của virus. Tuy nhiên nó không phải thụ thể chính cho EV-A71 mà chỉ đóng vai trò thụ thể bám dính hỗ trợ cho việc xâm nhiễm [16].

Heparan sulfate (HS) là một glycosaminoaglycan được sulfate hóa, hiện diện trong chất nền ngoại bào, và màng tế bào [17]. Tan và cộng sự đã chứng minh EV-A71 có khả năng liên kết với các tế bào RD thông qua các tương tác tĩnh điện trên bề mặt [18]. Mặc dù vậy không có ghi nhận nào về khả năng xâm nhiễm của EV-A71 thông qua HS; do đó HS được biết đến như một trong các thụ thể bám dính hỗ trợ virus trong quá trình xâm nhiễm (Hình 2).

Sialic acid (SA) còn được gọi là neuraminic acid, thường được liên kết với galactose hoặc các tiểu phần đường khác trên bề mặt tế bào với chức năng như một ăng-ten của các kháng nguyên nhóm máu, khối u hoặc các thụ thể xâm nhiễm của virus [19]. Yang và cộng sự đã công nhận rằng EV-A71 có thể sử dụng glycan liên kết SA trên tế bào biểu mô ruột như một thụ thể [20]. Việc loại bỏ SA trên bề mặt tế bào làm giảm khả năng gắn của virus lên các tế bào RD [21]. Như vậy, cũng giống như HS, SA trên bề mặt tế bào là thụ thể liên kết hỗ trợ cho việc xâm nhiễm của EV-A71 (Hình 2).

Ngoài những thụ thể trên, vẫn còn nhiều thụ thể khác góp vai trò hỗ trợ trong quá trình xâm nhiễm của virus như nucleolin, vimentin, proteoglycan, fibronectin,... nhưng tương tác của chúng với EV-A71 vẫn cần được làm rõ.

## 2. Con đường xâm nhiễm của EV-A71

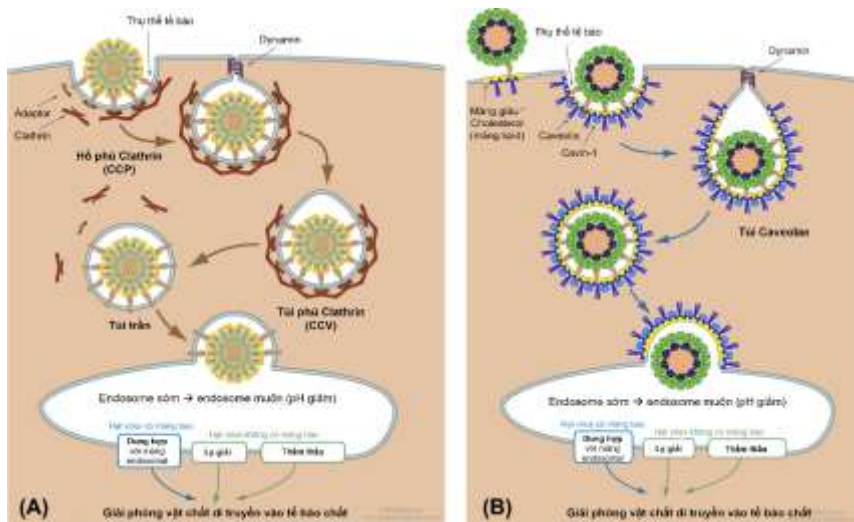
### 2.1. Xâm nhập phụ thuộc clathrin và caveolin

Leong và các cộng sự [22] đã chứng minh sự tham gia của clathrin là thiết yếu cho quá trình xâm nhiễm của EV-A71. Lin và các cộng sự [23] cũng chỉ ra sự xâm nhiễm của EV-A71 giảm đáng kể trên các dòng tế bào 3T3-SCARB2 được xử lý qua với các hợp chất ức chế clathrin. Từ đó, vai trò của SCARB2 được xác nhận như một thụ thể giúp

EV-A71 xâm nhập vào tế bào chủ phụ thuộc clathrin [23]. Trong đó sự tương tác giữa virus và SCARB2 là bước khởi sự cho toàn bộ quá trình. Sau đó, phức hợp thụ thể-virus được nhắm mục tiêu đến các hố phủ clathrin (clathrin coated cockpits/CCPs), hình thành các túi phủ clathrin (clathrin coated vesicles/CCVs), tạo ra các túi nội bào, và nội bào hóa các phân tử trong túi bao gồm cả virus (Hình 3 A).

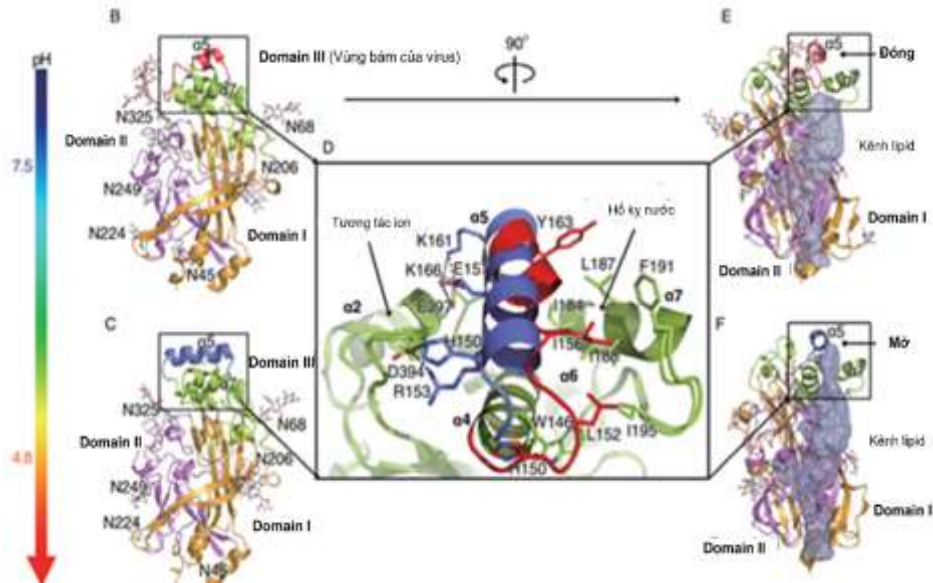
Tuy nhiên, sự xâm nhiễm và nhân lên của EV-A71 cũng được nhận thấy ở các dòng tế bào NIH3T3 không được chuyển gen SCARB2. Do đó, một số thụ thể tế bào khác có thể hoạt động như thụ thể xâm nhiễm cho EV-A71, mặc dù với độ đặc hiệu rất thấp [23]. Một trong số đó là PSGL-1. Lin và các cộng sự [24] đã chứng minh tế bào L929 từ chuột biểu hiện PSGL-1 của người có thể bị chủng EV-A71/E59 xâm nhiễm. Các nghiên cứu chỉ ra PSGL-1 làm trung gian cho quá trình xâm nhiễm phụ thuộc vào caveolin. Khi bám vào bề mặt màng nhờ PSGL-1, các hạt virus sẽ khuếch tán cho tới khi mắc kẹt ở các hố caveolae, và bắt đầu quá trình phosphoryl hóa tyrosine, hình thành đuôi actin và liên kết dynamin để xâm nhiễm vào tế bào [25] (Hình 3 B).

Quá trình này xảy ra đồng bộ với sự xâm nhập phụ thuộc clathrin của EV-A71 trong các tế bào RD. Do đó, cơ chế xâm nhập EV-A71 và kích hoạt nhiều con đường được xác định bởi sự biểu hiện của thụ thể tế bào chủ. Tuy vậy, con đường xâm nhập của EV-A71 thông qua hai loại thụ thể SCARB2 và PSGL-1 đã được tìm hiểu và là con đường chính của virus ở thời điểm hiện tại. Sự so sánh mức độ quan trọng của hai loại thụ thể này đã được thực hiện bởi nghiên cứu của Yamayoshi và các cộng sự [26]. SCARB2 và PSGL-1 liên kết với EV-A71 tại các vị trí khác nhau trên vỏ virus và ái lực tương tác của chúng là khác nhau. Mặc dù quan sát được PSGL-1 có ái lực mạnh hơn đối với một số chủng EV-A71, nó lại không phải là thụ thể chung cho tất cả các chủng, và PSGL-1 không kích hoạt quá trình cởi lớp vỏ virus, do đó quá trình khởi sự xâm nhiễm bởi PSGL-1 vẫn chưa được làm rõ [26]. Tóm lại, mặc dù PSGL-1 có khả năng giúp virus xâm nhập vào tế bào chủ, nó lại không hỗ trợ virus cởi lớp vỏ để giải phóng RNA như SCARB2. Chính vì vậy, SCARB2 mới chính là thụ thể mục tiêu quan trọng cho quá trình xâm nhiễm của EV-A71.



Hình 3 (A). Xâm nhập phụ thuộc clathrin: một hệ các protein adaptor và clathrin liên kết với thụ thể gắn với virus tạo ra một mô đun cơ học để kéo virus vào trong tế bào. Các hố phủ clathrin phân tách khỏi màng nhờ dynamin. Lớp vỏ clathrin và adaptin tách khỏi các túi phủ clathrin tạo thành các túi trần dung hợp với endosome và giải phóng virus [27, 28]. (B) Xâm nhập phụ thuộc caveolin: khi virus liên kết với các thụ thể trên các màng lipid giàu caveolin và cavin-1, sự nảy chồi của các túi caveolae được điều hòa bởi các enzyme kinase và phosphatase. Các túi này được phân cắt bởi dynamin và đưa virus vào trong các túi endosome [29, 30].

## 2.2. Quá trình cởi lớp vỏ và giải phóng RNA



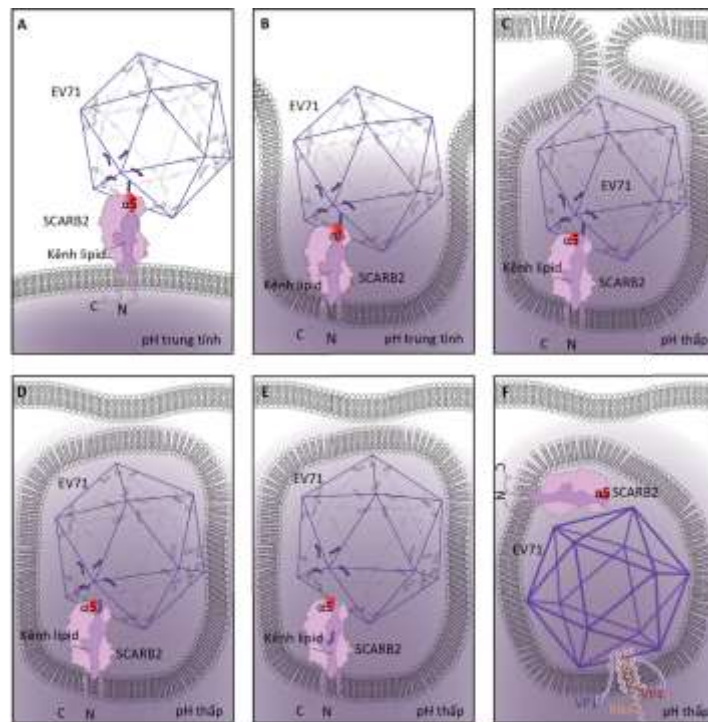
Hình 4. Sự thay đổi cấu trúc của thụ thể SCARB2 (domain III) khi pH môi trường thay đổi từ trung tính (pH 7.5) sang acid (pH 4.8): vùng xoắn  $\alpha 5$  và  $\alpha 7$  có sự thay đổi về cấu trúc gây ra sự đóng-mở của kênh lipid [8].

Sau khi được nội bào vào các túi endosome/lysosome, EV-A71 bắt đầu quá trình xâm nhiễm bằng việc tháo lớp vỏ capsid để giải phóng RNA vào tế bào chất, quá trình này có liên quan đến sự acid hóa bên trong các túi endosome [23]. Khi pH môi trường giảm, thụ thể SCARB2 đã được chứng minh là có sự thay đổi về cấu trúc ba bó xoắn ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  và  $\alpha 7$ ) ở domain III (Hình 4). EV-A71 độc lập không trải qua quá trình thay đổi cấu trúc ở môi trường acid, chính sự thay đổi cấu trúc phụ thuộc pH của thụ thể gây kích thích lên lớp vỏ capsid của virus, từ đó kích hoạt quá trình cởi lớp vỏ và xâm nhiễm [8]. Yamayoshi và Koike [31]; Zhao và các cộng sự [32] đã chỉ ra rằng pH 5,5 là điểm mà ở đó vùng liên kết giữa thụ thể và EV-A71 thể hiện tính linh hoạt đáng kể, ở pH cao hơn vùng này sẽ ổn định hơn. Sự thay đổi trong trạng thái proton của các gốc đường làm thay đổi các tương tác kỵ nước, hình thành các liên kết hydro mới và tương tác tĩnh điện bổ sung mới giữa các xoắn  $\alpha 5$ ,  $\alpha 4$ , và  $\alpha 7$  nhằm thực hiện việc đóng mở kênh lipid (Hình 4 E, F). Trong điều kiện pH acid, việc chuyển kênh lipid của SCARB2 từ dạng đóng sang dạng mở cho phép SCARB2 kích thích giải phóng nhân tổ tử nằm bên trong các rãnh canyon của virus. Sau đó, hạt EV-A71 giãn nở và trải

qua một loạt các thay đổi về cấu trúc để cởi bỏ lớp vỏ: đầu N của VP1 và VP4 chuyển từ trong ra ngoài, dẫn đến sự hình thành một kênh trong màng mà qua đó RNA của virus được vận chuyển và giải phóng vào tế bào chất (Hình 5) [8].

## 2.3. Dịch mã và xử lý các protein virus

Enterovirus A71 thuộc nhóm virus chứa vật chất di truyền là RNA mạch đơn (+) chiều dài khoảng 7,5 kb. Trình tự nucleotide hoàn chỉnh của chủng EV-A71 BrCr đã được xác định [5]. Khung đọc mở đơn (ORF) của EV-A71 được bao bọc bởi 5'UTR và 3'UTR, theo sau là đuôi poly (A), đầu 5' của bộ gen được liên kết cộng hóa trị với protein VPg của virus (Hình 1 C). ORF được chia thành ba vùng. P1 mã hóa bốn protein cấu trúc lớp vỏ. P2 và P3 mã hóa bảy protein phi cấu trúc, đảm nhiệm nhiều chức năng quan trọng như xử lý protein sau dịch mã, tạo phức hợp sao chép RNA và tham gia vào nhiều con đường tế bào khác nhau, cần thiết cho sự nhân lên của virus (Bảng 1). Các chức năng của 11 protein EV-A71 riêng lẻ này được cho là giống với chức năng được xác định đối với poliovirus và các loại non-polio enterovirus khác [33, 34].



Hình 5. Minh họa về quá trình xâm nhiễm của EV-A71 qua trung gian thụ thể SCARB2 dưới sự ảnh hưởng của pH. (A) phức hợp EV-A71-SCARB2. (B) EV-A71 xâm nhiễm thông qua SCARB2. (C) SCARB2 thay đổi cấu trúc và mở kênh lipid ở pH thấp (<math>< 5,5</math>). (D, E) Nhân tổ túi bị loại bỏ khỏi capsid của virus thông qua kênh lipid của SCARB2, EV-A71 trải qua các thay đổi về cấu trúc để cởi lớp vỏ. (F) EV-A71 phân ly khỏi SCARB2 và tạo thành một kênh trong màng để giải phóng RNA của nó bằng cách sử dụng đầu N của VP1 và VP4 [8].

S. R. Thompson, P. Sarnow [35] đã chứng minh sự dịch mã của EV-A71 có phụ thuộc IRES, vị trí xâm nhập vào bên trong của ribosome nằm trong 5'UTR, là một phần tử RNA cho phép bắt đầu dịch mã theo cách độc lập với mũ [35]. Trong quá trình xâm nhiễm, EV-A71 biểu hiện các protease 2Apro và 3Cpro, phân cắt yếu tố khởi đầu dịch mã eIF4G của sinh vật nhân chuẩn và đuôi poly(A)-binding protein. Việc này hỗ trợ virus ngừng bộ máy dịch mã của tế bào chủ, các sản phẩm phân cắt của eIF4G liên kết đặc biệt với miền V trên IRES của EV-A71, thúc đẩy sự hình thành của phức hợp tiền khởi đầu dịch mã 43S [36]. Quá trình dịch mã của EV-A71 đã được chứng minh là cần sự tham gia của protein liên kết RNA (RBP) từ tế bào chủ, được gọi là các yếu tố tác động chuyển đổi đặc hiệu (ITAFs). Hầu hết các ITAFs là các protein từ nhân được phân bổ lại trong tế bào chất khi tế bào nhiễm virus hoặc khi tế bào bị stress [37].

Các protein này đóng vai trò như các chaperone của IRES, liên kết với RNA trên nhiều miền và ổn định toàn bộ IRES trong một cấu trúc phù hợp để liên kết các yếu tố dịch mã và tiểu đơn vị ribosome [38]. Một số ITAFs phổ biến bao gồm ribonucleoprotein hạt nhân không đồng nhất A1 (hnRNP A1) [39], polypyrimidine protein liên kết đường 1 (PTB1) [40], protein liên kết 68-kDa Src trong nguyên phân (Sam68),... Các nghiên cứu đã xác nhận rằng hầu hết ITAFs có thể tăng cường hoạt động IRES của virus; tuy nhiên, một số ITAFs có thể ngăn chặn dịch mã qua trung gian IRES. Sự khởi đầu dịch mã của phần tử IRES không phụ thuộc vào mũ ở 5'UTR của bộ gen EV-A71 bắt đầu cho quá trình tổng hợp polyprotein EV-A71, đồng thời ngừng quá trình dịch mã của tế bào chủ [35]. Sau đó, các polyprotein này được xử lý bởi các protease virus 2Apro và 3Cpro thành các protein capsid cấu trúc và các protein chức năng.

Bảng 1 Các loại protein phi cấu trúc của EV-A71 [41, 42]

Protein	Chức năng
2A	Giữ vai trò quan trọng trong quá trình nhân lên của virus, xử lý polyprotein, chết tế bào theo chương trình (apoptosis), quá trình sinh bệnh và các quá trình khác. Hỗ trợ đào thoát miễn dịch, phân cắt protein NLRP3 ngăn chặn quá trình viêm.
2B, 2BC	Gây sự thay đổi màng, tạo các kênh vận chuyển ion trong các tế bào bị nhiễm bệnh. Thay đổi tính thấm của màng sinh chất làm xáo trộn cân bằng nội môi của phức hợp Golgi, tăng sự nhân lên của virus, gây ly giải tế bào.
2C	Tham gia vào quá trình sắp xếp lại các protein màng tế bào chủ và hình thành phức hợp sao chép của virus. Đảm bảo sự nhân lên hiệu quả của EV-A71. Đào thoát miễn dịch bẩm sinh: ức chế kích hoạt IKK $\beta$ , do đó ngăn chặn kích hoạt NF- $\kappa$ B.
3A	Ức chế sự bài tiết protein của tế bào. Tạo điều kiện thuận lợi cho sự sao chép RNA của virus.
3AB	Neo phức hợp sao chép vào các ngăn túi màng do virus gây ra. Kích thích hoạt động protease của 3CD, và có thể đóng vai trò như một mỏ neo cho polymerase 3D trong các phức hợp sao chép RNA.
3B	VPg đã được chứng minh là tương tác với polymerase 3D poliovirus. Làm mờ cho quá trình sao chép RNA.
3CD	Thể hiện hoạt tính của protease nhưng không có hoạt tính polymerase.
3C	Phân cắt polyprotein tiền thân trong quá trình nhân lên của virus. Chứa một yếu tố quyết định độc lực mới liên quan đến sự lây nhiễm EV-A71. Giúp đào thoát miễn dịch và điều chỉnh quá trình chết tế bào theo chương trình.
3D	RNA polymerase 3D của virus là một trong những thành phần chính của phức hợp sao chép RNA của virus. 3Dpol cũng có thể góp phần lẫn tránh khả năng miễn dịch bẩm sinh. 3Dpol làm giảm tín hiệu IFN- $\gamma$ kèm theo giảm biểu hiện STAT1.

## 2.4. Quá trình sao chép RNA và giải phóng các hạt virus

### 2.4.1. Tạo túi màng

Do bản chất EV-A71 là RNA virus sợi (+), giống với các virus RNA sợi (+) khác, EV-A71 trải qua quá trình sao chép RNA trong các túi màng của các tế bào bị nhiễm [43]. EV-A71 sau khi xâm nhiễm vào tế bào, trải qua quá trình dịch mã và xử lý các polyprotein thành các protein chức năng, các protein này hình thành các ngăn chứa tế bào chất và RNA virus (Hình 6). Những ngăn này có thể mang nhiều nguồn gốc khác nhau, bao gồm lưới nội chất, bộ máy Golgi, ty thể, hoặc từ endolysosome [44]. Một số quan sát cho thấy sự tập trung của các túi màng và phức hợp sao chép RNA-màng hiện diện khi tế bào nhiễm một số loại virus điển hình

là poliovirus [45]. Dự kiến, tương tự như các picornavirus khác, EV-A71 sẽ sử dụng các cơ chế tương tự để sao chép RNA bộ gen của nó. Một con đường khác trong quá trình sao chép của EV-A71 là sự tự thực bào (autophagy). Khi bị nhiễm EV-A71, các túi dạng thực bào (autophagosome-like vesicle) và túi thực bào (autophagosome) được tích lũy trong tế bào chất, được bao quanh bởi các protein LC3 và VP1 [46]. Người ta vẫn chưa hiểu rõ những con đường truyền tín hiệu nào tham gia vào quá trình này, cũng như cơ chế mà picornavirus tạo ra các bóng màng và cách điều hướng phức hợp sao chép RNA của chúng đến các màng nội bào này. Hơn nữa, các thành phần tế bào tham gia vào quá trình này vẫn còn chưa được xác định rõ ràng.



## 2.4.2. Sao chép RNA ở EV-A71

### 2.4.2.1. Sao chép phụ thuộc enzyme của virus

Quá trình sao chép RNA của EV-A71 được thực hiện nhờ enzyme RNA polymerase phụ thuộc khuôn mẫu là RNA (RdRP), hay 3D polymerase. Enzyme này nằm ở đầu N của chuỗi polypeptide lõi xúc tác tổng hợp chuỗi RNA từ cả khuôn mẫu sợi âm và sợi dương [47]. Poliovirus 3D polymerase bắt đầu tổng hợp chuỗi RNA bằng cách kéo dài một đoạn mỗi protein, VPg (3B). VPg là một protein với 20 đến 22 amino acid, được liên kết cộng hóa trị với đầu 5' của RNA picornavirus. 3Dpol sử dụng UTP và Tyr3 được bảo tồn của VPg để gắn nhóm uridylyl vào VPg, tạo thành VPg-pUpU [48, 49]. RNA virus sợi (+) được sao chép bởi 3Dpol và mỗi VPg-pUpU, để tạo ra RNA sợi (-), sau đó sẽ được sử dụng làm khuôn để nhân bản các RNA virus sợi (+) (Hình 6).

Quá trình bổ sung nhóm uridylyl vào VPg của picornavirus được xúc tác bởi polymerase 3D và 3CD (Bảng 1), xảy ra theo cơ chế phụ thuộc vào khuôn mẫu để chuyển một hoặc hai gốc uridylyl thành VPg [50]. Khuôn mẫu tự nhiên được sử dụng là một cấu trúc thân vòng (stem-loop) nhỏ còn gọi là yếu tố sao chép tác động *cis* hay CRE [51]. CRE hiện diện trong vùng mã hóa 2C của các loài enterovirus ở người, bao gồm cả EV-A71 [52]. Một số nghiên cứu đang cố gắng xác minh sự tổng hợp cả sợi (+) và sợi (-) cần khuôn có nguồn gốc CRE [53]. Hơn thế nữa, mặc dù CRE rất cần thiết cho sự nhân lên của picornavirus, trình tự CRE chính xác của EV-A71 vẫn chưa được xác định bằng thực nghiệm mà chỉ được dự đoán tương đồng với các enterovirus khác.

### 2.4.2.2. Sao chép phụ thuộc enzyme tế bào chủ

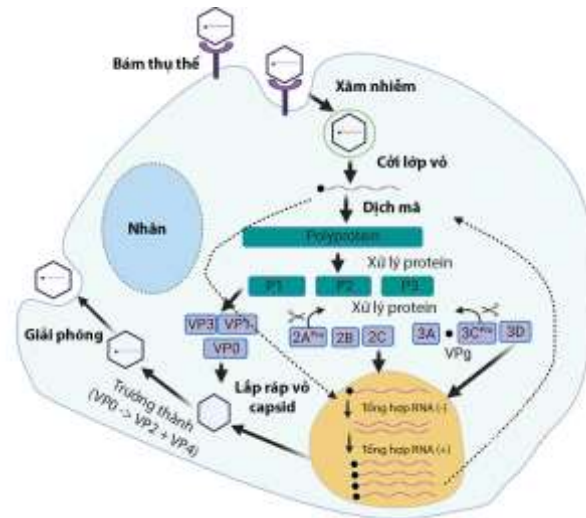
Trong quá trình sao chép RNA virus, EV-A71 cũng có một số cơ chế lợi dụng các protein của tế bào chủ để thúc đẩy sự nhân lên của chính nó. Một trong số các protein là hnRNP K, một protein liên kết với RNA. Lin và cộng sự đã xác định hnRNP K là một trong những protein cần thiết cho sự sao chép của EV-A71. hnRNP K liên kết với EV-A71 ở vùng 5'UTR. Sự thiếu hụt hnRNP K trong các tế bào bị knockdown làm giảm quá trình tổng hợp cả sợi RNA của

EV-A71 [54]. Protein RTN3 là một protein nội bào tham gia vào quá trình vận chuyển màng, ổn định cấu trúc của mạng lưới nội chất và bài tiết protein. Tang và cộng sự đã chứng minh RTN3 có thể liên kết với phức hợp sao chép, thông qua tương tác trực tiếp với protein EV-A71 2C, và có vai trò trong việc điều chỉnh sự sao chép của EV-A71 [55]. Các protein của tế bào chủ đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sao chép của EV-A71. Tuy nhiên, cách thức mà chúng hoạt động cùng với sự xâm nhiễm của EV-A71 cần được nghiên cứu sâu hơn, từ đó tìm ra loại protein nào giữ vai trò quyết định đối với sự sao chép của EV-A71 và ở mức độ nào chúng là nguyên nhân bệnh sinh của EV-A71.

## 2.5. Đóng gói RNA và giải phóng các hạt virus

Có nhiều gợi ý cho rằng EV-A71 trải qua quá trình đóng gói và giải phóng tương đồng với poliovirus. Sau quá trình sao chép và dịch mã, các hạt virus sẽ được lắp ráp trong tế bào chất. Trước hết, một protomer 5S được lắp ráp từ các protein VP1, VP3 và VP0 (tiền thân của VP4 và VP2). Sau đó, các chất phản ứng tự lắp ráp thành các pentamer 14S, được đóng gói thêm thành capsid rỗng 80S. RNA mới tổng hợp được đóng gói vào capsid rỗng, tạo ra các hạt tiền virus 150S, sau đó VP0 được phân cắt thành VP2 và VP4, các hạt virus cuối cùng phát triển thành virus lây nhiễm [56].

Sự chết và ly giải cấu trúc tế bào là sự kiện thiết yếu đối với sự giải phóng của các hạt virus mới. Nhờ vào sự đa dạng và linh hoạt của các loại enzyme mà EV-A71 có thể gây ra chết tế bào theo chương trình phụ thuộc hoặc không phụ thuộc caspase, tương ứng là con đường sử dụng 2Apro hoặc 3Cpro. Sự biểu hiện của 2Apro kích hoạt sự phân cắt eIF4GI, từ đó gây ra chết tế bào một cách nhanh chóng và không phụ thuộc caspase [57]. Trong khi, 3Cpro gây ra chết tế bào theo chương trình phụ thuộc caspase [58]. Ngoài ra, các hạt virus chưa phát triển cũng có thể được giải phóng nhờ các túi giống với túi thực bào mà không làm chết hoặc ly giải cấu trúc tế bào (Hình 6). Tuy nhiên, cơ chế chi tiết của quá trình này phần lớn vẫn chưa được biết rõ [59].



Hình 6. Sơ đồ tóm tắt chu trình xâm nhiễm của EV-A71: sau khi gắn với thụ thể tế bào đặc hiệu, EV-A71 xâm nhập vào tế bào chủ, cởi lớp vỏ, và giải phóng RNA. Chuỗi polyprotein của virus được dịch mã và phân cắt tạo các protein cấu trúc và chức năng. Các protein cấu trúc được lắp ráp tạo lớp vỏ capsid rỗng. Các protein chức năng hỗ trợ quá trình tạo túi màng sao chép RNA, đóng gói RNA và giải phóng các hạt virus mới [60].

### 3. Các chiến lược ngăn chặn sự xâm nhiễm của EV-A71

Từ các thông tin trên, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm mục tiêu vào các giai đoạn khác nhau trong chu trình sống của virus nhằm ức chế và ngăn chặn sự phát triển của nó [60].

#### 3.1. Ngăn chặn sự bám của virus với thụ thể tế bào

##### 3.1.1. Chiến lược sử dụng thụ thể liên kết với EV-A71

Tương tác của virus với thụ thể vật chủ là sự kiện đầu tiên trong quá trình xâm nhiễm của virus, do đó các chất ức chế ngăn chặn quá trình này có thể hoạt động như một liệu pháp điều trị và phòng ngừa tiềm năng. Việc sử dụng chính các dạng hòa tan của thụ thể liên kết với EV-A71 như một phân tử ức chế sự bám của virus là một giải pháp tự nhiên mang nhiều triển vọng. Các loại thụ thể như SCARB2 hòa tan, PSGL-1, sialic acid, và heparan sulfate đã được chứng minh là có tác dụng ức chế chống lại sự lây nhiễm EV-A71 *in vitro* [7, 20, 26, 61]. Trong đó, SCARB2 mang nhiều tiềm năng hơn vì là thụ thể chung cho tất cả các chủng EV-A71 và kể cả CV-A16 [7]. Những nghiên cứu chuyên sâu về cấu trúc virus liên kết với thụ thể này đã được tìm hiểu rõ ràng, và SCARB2 đã được đồng hóa thành công trên hệ thống biểu hiện ở

*Escherichia coli* cùng với khả năng bám lên virus đã được đánh giá với hiệu quả cao, điều này cung cấp nền tảng cho các thí nghiệm ứng dụng lâm sàng cũng như có tiềm năng công nghiệp hóa để sản xuất thuốc hay thực phẩm chức năng [56, 57]. Quan trọng hơn, việc ứng dụng thụ thể tái tổ hợp có bản chất là protein có thể đảm bảo độ an toàn đối với cơ thể người. Mặc dù cần thêm nhiều nghiên cứu chuyên sâu cũng như kết hợp thử nghiệm lâm sàng, chiến lược sử dụng thụ thể SCARB2 tái tổ hợp trong việc cấu trúc nên các bẫy virus vẫn mang tiềm năng và triển vọng to lớn trong công cuộc phòng chống EV-A71.

##### 3.1.2. Chiến lược sử dụng các hợp chất khác

Cho đến hiện tại, bên cạnh các thụ thể liên kết, nhiều hợp chất ngăn chặn sự bám của virus lên bề mặt tế bào đã và đang được nghiên cứu. Một trong số đó là suramin được sulfate hóa cao, NF449, và Kappa carrageenan từ rong biển có hoạt tính kháng virus thông qua việc nhắm mục tiêu vào sự gắn kết và xâm nhập của EV-A71 [62, 63]. Lactoferrin từ bò, và lactoferrin từ người được tìm thấy có khả năng ức chế sự xâm nhiễm của EV-A71 trong các tế bào RD trong giai đoạn đầu của quá trình lây nhiễm, mặc dù cơ chế vẫn chưa được làm rõ [64]. Tại Việt Nam, nghiên cứu nhắm vào

kháng thể IgY-sản xuất từ lòng đỏ trứng gà có khả năng trung hòa đáng kể lượng EV-A71 *in vitro* với hiệu giá trung hòa đạt giá trị 1/16 [65].

### 3.2. Ngăn chặn quá trình xâm nhập và cởi lớp vỏ virus

EV-A71 có thể xâm nhập qua hai con đường là clathrin và caveolin thông qua [23, 24]. Việc sử dụng một số siRNA đặc hiệu cho clathrin hoặc dynamin hoặc các chất ức chế hóa học đều có khả năng can thiệp vào sự xâm nhập của EV-A71 [23]. Tuy nhiên, con đường xâm nhiễm của virus có liên quan đến nhiều quá trình sinh dưỡng quan trọng khác nhau trong tế bào, việc ức chế con đường này có thể gây ra nhiều hệ lụy nghiêm trọng ảnh hưởng đến hoạt động và chức năng bình thường của tế bào sống. Chính vì vậy, việc ngăn chặn quá trình xâm nhiễm của virus không mang lại giá trị cao trong ứng dụng lâm sàng. Các chất ức chế nhắm vào quá trình cởi lớp vỏ virus đã được nghiên cứu chuyên sâu có khả năng chống lại nhiều loại picornavirus như rhinovirus, poliovirus [66], echovirus [67], và coxsackievirus [68]. Pleconaril, một phân tử liên kết với vỏ capsid, đã được chứng minh là có phổ hoạt động rộng chống lại rhinovirus và enterovirus bằng cách can thiệp vào vị trí liên kết với thụ thể capsid, dẫn đến sự ức chế virus gắn vào tế bào [60]. Một loạt các hợp chất WIN được sửa đổi từ khuôn mẫu pleconaril, bao gồm BPROZ-194, BPROZ-112, BPROZ-284, đã được tìm thấy có khả năng gắn với các nhân tố túi của EV-A71, giúp ổn định cấu trúc capsid, từ đó ngăn chặn cơ chế cởi vỏ do thụ thể gây ra [60, 69]. Mặc khác, các chất ức chế nhắm mục tiêu vào VP1 và nhân tố túi của virus giúp ổn định lớp vỏ capsid ngăn chặn quá trình giải phóng RNA cũng là một trong các chiến lược tiềm năng. PR66 là một dẫn xuất của imidazolidinone có khả năng ổn định VP1 và ngăn cản quá trình xâm nhiễm của EV-A71 trên mô hình chuột *in vivo* [70].

### 3.3. Ức chế quá trình dịch mã của EV-A71

Dịch mã RNA là bước quan trọng trong quá trình nhân lên và gây bệnh của virus. Thông

thường, nhiều loại virus sử dụng bộ máy dịch mã của tế bào chủ để thực hiện quá trình tổng hợp protein. Do đó, phát triển các chất kháng virus ức chế sự tổng hợp protein của virus mà không ảnh hưởng đến các quá trình dịch mã của tế bào chủ là một trong những khó khăn của chiến lược nhắm đến bộ máy dịch mã [71]. Để thay thế cho các hợp chất ức chế tổng hợp protein, việc sử dụng các đoạn nucleic acid nhỏ nhằm mục tiêu vào các đoạn gen đặc hiệu của virus nhằm ngăn cản dịch mã có tiềm năng khắc phục hạn chế của chiến lược này. RNA can thiệp (RNA interference - RNAi) là các oligonucleotide liên kết với RNA bằng liên kết bổ sung và có thể điều chỉnh chức năng của RNA mục tiêu [72]. RNAi nhỏ nhằm mục tiêu vào các vùng được bảo tồn cao như 5' UTR [73], VP1, VP2 [74], 2 C, 3 C, 3 D [75, 76], và 3'UTR [75] của bộ gen virus gây phân cắt RNA qua phức hợp làm im lặng đã ức chế đáng kể sự lây nhiễm EV-A71. Plasmid mã hóa cho RNA dạng kẹp tóc ngắn (short hairpin RNA - shRNA), và RNA can thiệp kích thước nhỏ (small interfering RNA - siRNA) tổng hợp được chỉnh sửa gắn thêm nhóm methyl có khả năng nhắm mục tiêu vào các đoạn vùng mã hóa các protein cấu trúc, và protein phi cấu trúc ngăn chặn hiệu quả sự nhân lên của virus [75, 77]. Trong đó siRNA, và shRNA ức chế tổng hợp protein 3 D cho thấy khả năng ngăn ngừa các biến chứng của EV-A71, và tỉ lệ tử vong ở mô hình *in vivo* trên chuột [76]. Các hợp chất điều chỉnh giảm hoạt động của quá trình dịch mã phụ thuộc IRES có thể được phát triển thành các chất kháng virus. Một số chất như Geniposide có nguồn gốc từ cây Dành Dành (*Fructus gardeniae*), Kaempferol, Amantadine, có khả năng ức chế sự nhân lên của EV-A71 thông qua ức chế hoạt động IRES và ITAFs [78-80]

### 3.4. Ngăn chặn quá trình xử lý protein của các protease virus

Hoạt động của hai loại enzyme 2 A protease và 3 C protease là cần thiết cho sự phân cắt chuỗi polyprotein thành các đoạn protein cấu trúc, và chức năng. Hơn nữa, hai loại protease này còn được cho là tham gia vào nhiều con đường quan trọng khác nhau trong quá trình xâm nhiễm

[41, 42]. Vai trò thiết yếu của các protease này trong quá trình nhân lên của virus khiến chúng trở thành mục tiêu hấp dẫn cho các liệu pháp điều trị kháng EV-A71. Rupintrivir, và một loạt các dẫn xuất của nó, là một loại peptide aldehyde được thiết kế để tạo thành các sản phẩm cộng hóa trị với 3Cpro của rhinovirus và ức chế hoạt tính của nó, từ đó cho thấy khả năng ngăn chặn đáng kể sự lây nhiễm EV-A71 cả *in vitro* và *in vivo* [81, 82]. Các flavonoid như fisetin, và rutin, cũng đã được xác định là chất ức chế protease 3C [83]. Một số phối tử peptide được chọn từ thư viện cDNA nhau thai người bằng quy trình sàng lọc kép bằng nấm men (yeast two-hybrid) đã ức chế hoạt động của protease 2A của rhinovirus. Chuỗi peptide gồm sáu amino acid LVLQTM hoạt động như một chất tương tự cơ chất của 2Apro, và cạnh tranh vào vị trí hoạt động của protease đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự sao chép của virus *in vitro* [84]. Tuy nhiên, cần có thêm nhiều nghiên cứu chuyên sâu để áp dụng lâm sàng.

### 3.5. Ức chế quá trình sao chép RNA và giải phóng virion.

Sự sao chép RNA ở EV-A71 phụ thuộc rất nhiều vào RNA polymerase 3 D [47]. Chính vì thế chiến lược nhắm mục tiêu vào 3Dpol mang tiềm năng lớn để phát triển các loại thuốc kháng EV-A71. Trong số đó, Ribavirin (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxyamine) là một chất tương tự nucleoside thông thường, nhắm mục tiêu RdRP của picornavirus [85]. Ribavirin đã thể hiện sự kháng lại EV-A71 thông qua quá trình gây đột biến gây chết virus thông qua sao chép RNA trên các tế bào RD, đồng thời ngăn ngừa tế bào chết và tử vong do EV-A71 ở chuột [86, 87]. Gần đây, DTriP-22 là một dẫn xuất pyrazolo pyrimidine chứa piperazine cũng đã được chứng minh là nhắm mục tiêu hiệu quả đến RdRP của tất cả các chủng EV-A71, và có khả năng ngăn chặn sự tổng hợp của RNA sợi (+) và sợi (-) trong quá trình lây nhiễm [88]. Chrysofenetin và lactidein, hai flavonol được phân lập từ lá cây cúc thơm *Laggera pterodonta*, cho thấy hoạt động mạnh mẽ trong việc ức chế sự sao chép RNA của virus trên tế bào Vero và RD với độc tính tế bào thấp [89]. Retro-2cycl là một chất ức chế các độc tố Shiga của *Escherichia coli*, và

có hoạt tính kháng lại một số virus như adeno, polyomavirus và papillomavirus bằng cách can thiệp vào quá trình vận chuyển túi nội bào được các virus và độc tố này sử dụng. Các nghiên cứu sơ bộ về cơ chế cho thấy rằng Retro-2cycl không ức chế quá trình tổng hợp protein EV-A71 hoặc sao chép RNA nhưng có thể ngăn chặn sự giải phóng EV-A71 hiệu quả [90].

### 3.6. Chiến lược nhắm vào các nhân tố tế bào chủ

Ngoài các chiến lược nhắm mục tiêu vào quá trình xâm nhiễm và sinh tổng hợp của virus, các tác nhân từ tế bào chủ cũng đóng góp vai trò thiết yếu cho chu trình sống của EV-A71. Các chiến lược nhắm vào các tác nhân từ tế bào chủ vẫn còn nhiều mặt hạn chế do có thể ảnh hưởng đến sự sinh trưởng bình thường của tế bào và cơ thể. Tuy cần nhiều nghiên cứu chuyên sâu thử nghiệm cả *in vitro* và *in vivo* để đảm bảo độ an toàn cho con người thì đây cũng là một chiến lược nên được xem xét.

Sự sao chép bộ gen của enterovirus đã được chứng minh là xảy ra trong các khoang màng trong tế bào chất và có liên quan đến các tín hiệu cho quá trình tự thực bào. Sự kích hoạt của con đường Raf-1/ERK trong tế bào chủ tạo ra tín hiệu tự thực bào, và nhờ đó hỗ trợ cho việc nhân lên của virus. GW5074, một hợp chất hóa học có khả năng ức chế enzyme tyrosine kinase cần thiết để hoạt hóa con đường Raf-1. Sự sao chép của EV-A71 đòi hỏi sự hình thành thể tự thực bào có thể bị ức chế khi có sự hiện diện của hợp chất này [62]. Việc nhiễm EV-A71 còn dẫn đến tăng căng thẳng oxy hóa trong tế bào chủ [91]. Epigallocatechin gallate (EGCG) là một trong các hợp chất polyphenol được tách chiết từ lá trà xanh với khả năng chống oxy hóa cao, việc bổ sung 10  $\mu$ M EGCG trên các tế bào Vero và lây nhiễm với EV-A71 cho thấy có sự giảm đáng kể lượng RNA virus sau 48 giờ. Tuy nhiên mối liên hệ này vẫn chưa rõ để có thể kết luận về khả năng ức chế EV-A71 của EGCG [92].

Sự cảm ứng của các interferon loại I (IFNs) là một phản ứng miễn dịch sớm, không đặc hiệu của vật chủ đối với các bệnh do virus gây ra có thể dẫn đến việc kích hoạt các cơ chế kháng virus. Liu và cộng sự, 2005, đã chứng minh interferon loại I có tác dụng bảo vệ trực tiếp

trên các dòng tế bào người bị nhiễm EV-A71 [93]. Tuy nhiên, EV-A71 có thể làm gián đoạn tín hiệu IFN bằng cách làm giảm thụ thể IFN I [94]. Aloe-emodin, một dẫn xuất anthraquinone có nguồn gốc thực vật, có thể gây ra sự biểu hiện IFN- $\alpha$  tăng gấp 2,5 lần trong các tế bào u nguyên bào tủy ở người. Xử lý các tế bào promonocyte HL-CZ và TE 671 với aloe-emodin cho thấy sự giảm khả năng hình thành mảng bám khi lây nhiễm với EV-A71. Từ đó cho thấy aloe-emodin có tiềm năng trở thành một chất kháng virus hiệu quả [95].

### 3.7. Một số chất ức chế chưa xác định rõ mục tiêu và cơ chế

Đối với việc điều trị virus, việc xem xét khả năng kháng virus của các loại thuốc đã được sử dụng trên người mang tiềm năng ứng dụng to lớn. Trong số đó, Chloroquine là một chất điều trị sốt rét đã được sử dụng trên người có khả năng kháng virus mạnh và đa dạng mục tiêu như coronavirus hay HIV. Các nghiên cứu về quá trình chết tế bào theo chương trình do virus đã ngẫu nhiên phát hiện khả năng chống EV-A71 của chloroquine [96]. Tương tự như vậy, Micafungi là một chất kháng nấm được báo cáo là có thể chống lại sự xâm nhiễm EV-A71 nhờ ức chế sự tăng sinh và nhân bản của virus *in vitro* [97]. Các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế của các hợp chất này cho thấy có liên quan đến nhiều mục tiêu và quá trình trong chu trình sống của virus.

Ngoài các chất ức chế tổng hợp đã được nghiên cứu, một số hợp chất tự nhiên cũng được phát hiện về khả năng chống EV-A71. Allophycocyanin là một protein huỳnh quang thu nhận từ tảo biển *Spirulina platensis* có thể ngăn chặn quá trình chết tế bào theo chương trình do EV-A71 gây ra, làm chậm quá trình tổng hợp RNA của virus [98]. Lá trà (Piper betle L.) từ lâu đã được sử dụng làm thuốc cổ truyền ở các quốc gia Đông Nam Á, một nhóm nghiên cứu tại Việt Nam đã khảo sát hoạt tính kháng EV-A71 của lá trà và có những kết quả đáng mong đợi. Ở nồng độ pha loãng 1/512 (tương đương 0,59 mg tinh chất lá trà/100 mL chế phẩm), thuốc nước chứa tinh chất lá trà, mật độ EV-A71 trong các tế bào RD-A giảm từ  $10^{0.6}$  đến  $10^{1.0}$  lần [99]. Mặc dù

khả năng kháng sự xâm nhiễm của EV-A71 ở các hợp chất này đã được chứng minh, tuy nhiên cơ chế chính xác vẫn còn chưa được làm rõ. Không chỉ vậy, nhiều hợp chất tự nhiên khác có khả năng chống EV-A71 vẫn chưa được khám phá.

### 3.8. Các nghiên cứu về vaccine

Đối với việc ngăn ngừa các bệnh gây ra bởi virus, vaccine luôn là ưu tiên hàng đầu. Đặc biệt, VP1 chứa chủ yếu là các yếu tố quyết định kháng nguyên (epitope) trung hòa, có thể sử dụng làm chỉ thị sinh học để đánh giá hiệu lực vaccine [100]. Protein VP1 tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên hệ thống *E. coli* BL21(DE3), cung cấp thêm cơ sở cho nghiên cứu về kháng nguyên vaccine [101]. Mặt khác, các nghiên cứu bước đầu về tạo chủng vaccine dự tuyển EV-A71 trên tế bào Vero đã giúp xác định chủng tối ưu nhất, làm tiền đề cho các nghiên cứu tạo vaccine trong nước [102]. Đồng thời, nghiên cứu về sự thích nghi của EV-A71 trên tế bào Vero và những thông tin siêu cấu trúc của virus và tế bào sau khi gây nhiễm ở các khoảng thời gian khác nhau đã được tiến hành, cung cấp những thông tin hữu ích cho sự nghiên cứu và phát triển vaccine phòng bệnh TCM trên dòng tế bào Vero, mở ra nhiều tiềm năng cho việc phòng ngừa dịch TCM [103]. Năm 2016, Trung Quốc đã lưu hành vaccine phòng ngừa EV-A71 đầu tiên, mang lại hiệu quả kháng lại virus hiệu quả ở nhiều thành phố lớn. Tuy vậy, vaccine hiện tại không được lưu hành ở các quốc gia khác, và tính hiệu quả và độ an toàn vẫn cần thời gian dài để kiểm chứng [104].

## 4. Kết luận

Bệnh Tay Chân Miệng gây ra bởi EV-A71 là một trong những căn bệnh truyền nhiễm đáng lo ngại ở nhiều quốc gia trên thế giới, và cả Việt Nam. Nhiều nghiên cứu và những hiểu biết về chu trình sống, con đường xâm nhiễm, và cơ chế bệnh sinh của virus, đã cung cấp một lượng lớn thông tin cần thiết trong công cuộc nghiên cứu và khám phá các chất, hợp chất có khả năng phòng chống sự xâm nhiễm của EV-A71.

Cho đến thời điểm hiện tại, các hợp chất kháng EV-A71 vẫn vướng phải nhiều hạn chế

khi thử nghiệm lâm sàng trên người do cần phải đánh giá tính an toàn và nhân đạo khắt khe. Do đó, các chiến lược phòng ngừa bệnh TCM gây ra bởi virus bằng các con đường hỗ trợ hoặc bổ sung như bẫy sinh học từ các thụ thể virus biểu hiện bề mặt trên các probiotic thể hiện nhiều điểm sáng trong tương lai. Hơn thế nữa, vaccine vẫn là chiến lược tối ưu đang được hoàn thiện quá trình đánh giá và kiểm tra tính hiệu quả cũng như độ an toàn. Với những nỗ lực không ngừng nghỉ trong việc khám phá các chất kháng virus để dự phòng hoặc điều trị, việc sớm đưa ra lâm sàng các loại thuốc/thực phẩm chức năng có khả năng ngăn chặn sự bùng phát của dịch TCM gây ra bởi EV-A71 là một điều có thể dự đoán.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] J. Puenpa, N. Wanlapakorn, S. Vongpunsawan, Y. Poovorawan, The History of Enterovirus A71 Outbreaks and Molecular Epidemiology in the Asia-Pacific Region, *J. Biomed Sci*, Vol. 26, No. 1, 2019, pp. 75, <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0573-2>.
- [2] Y. Chen, C. Li, D. He, T. Cheng, S. Ge, J. W. K. Shih, Q. Zhao, P. J. Chen, J. Zhang, N. J. V. Xia, Antigenic Analysis of Divergent Genotypes Human Enterovirus 71 Viruses By A Panel of Neutralizing Monoclonal Antibodies: Current Genotyping of EV71 does not Reflect Their Antigenicity, *Vaccine*, Vol. 31, No. 2, 2013, pp. 425-430, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.032>.
- [3] C. C. Yip, S. K. Lau, J. Y. Lo, K. H. Chan, P. C. Woo, K. Y. Yuen, Genetic Characterization of EV71 Isolates from 2004 to 2010 Reveals Predominance and Persistent Circulation of The Newly Proposed Genotype D and Recent Emergence of a Distinct Lineage of Subgenotype C2 in Hong Kong, *Virol J*, Vol. 10, No., 2013, pp. 222, <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-222>.
- [4] S. W. Huang, D. Cheng, J. R. Wang, Enterovirus A71: Virulence, Antigenicity, and Genetic Evolution over the Years, *J. Biomed Sci*, Vol. 26, No. 1, 2019, pp. 81, <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0574-1>.
- [5] B. A. Brown, M. A. Pallansch, Complete Nucleotide Sequence of Enterovirus 71 is Distinct from Poliovirus, *Virus Research*, Vol. 39, No. 2-3, 1995, pp. 195-205, [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)00087-9](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00087-9).
- [6] E. J. Yi, Y. J. Shin, J. H. Kim, T. G. Kim, S. Y. Chang, Enterovirus 71 Infection and Vaccines, *Clin Exp Vaccine Res*, Vol. 6, No. 1, 2017, pp. 4-14, <https://doi.org/10.7774/cevr.2017.6.1.4>.
- [7] S. Yamayoshi, K. Fujii, S. Koike, Scavenger Receptor B2 as a Receptor for Hand, Foot, and Mouth Disease and Severe Neurological Diseases, *Front Microbiol*, Vol. 3, 2012, pp. 32, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00032>.
- [8] M. Dang, X. Wang, Q. Wang, Y. Wang, J. Lin, Y. Sun, X. Li, L. Zhang, Z. Lou, J. Wang, Z. Rao, Molecular Mechanism of SCARB2-mediated Attachment and Uncoating of EV71, *Protein Cell*, Vol. 5, No. 9, 2014, pp. 692-703, <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0087-3>.
- [9] E. L. Eskelinen, Y. Tanaka, P. Saftig, at the Acidic Edge: Emerging Functions for Lysosomal Membrane Proteins, *Trends in Cell Biology*, Vol. 13, No. 3, 2003, pp. 137-145, [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(03\)00005-9](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(03)00005-9).
- [10] K. Fujii, N. Nagata, Y. Sato, K. C. Ong, K. T. Wong, S. Yamayoshi, M. Shimanuki, H. Shitara, C. Taya, S. Koike, Transgenic Mouse Model for the Study of Enterovirus 71 Neuropathogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 110, No. 36, 2013, pp. 14753-14758, <https://doi.org/10.1073/pnas.1217563110>.
- [11] Y. Nishimura, H. Shimizu, Identification of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 as One of the Cellular Receptors for Enterovirus 71, *Uirusu*, Vol. 59, No. 2, 2009, pp. 195-203, <https://doi.org/10.2222/jsv.59.195>.
- [12] Y. Nishimura, M. Shimojima, Y. Tano, T. Miyamura, T. Wakita, H. Shimizu, Human P-selectin Glycoprotein Ligand-1 is a Functional Receptor for Enterovirus 71, *Nat Med*, Vol. 15, No. 7, 2009, pp. 794-797, <https://doi.org/10.1038/nm.1961>.
- [13] Y. Nishimura, T. Wakita, H. J. P. P. Shimizu, Tyrosine Sulfation of the Amino Terminus of PSGL-1 is Critical for Enterovirus 71 Infection, *Vol. 6, No. 11, 2010, pp. e1001174*.
- [14] J. Liu, W. Dong, X. Quan, C. Ma, C. Qin, L. Zhang, Transgenic Expression of Human P-selectin Glycoprotein Ligand-1 is not Sufficient for Enterovirus 71 Infection in Mice, *Arch Virol*, Vol. 157, No. 3, 2012, pp. 539-543, <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1198-2>.
- [15] A. C. R. Dempsey, A. Rezvnpour, G. S. Shaw, S100-Annexin Complexes-structural Insights, *FEBS J*, Vol. 275, No. 20, 2008, pp. 4956-4966, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06654.x>.
- [16] S. L. Yang, Y. T. Chou, C. N. Wu, M. S. Ho, Annexin II Binds to Capsid Protein VP1 of

- Enterovirus 71 and Enhances Viral Infectivity, *J. Virol*, Vol. 85, No. 22, 2011, pp. 11809-11820, <https://doi.org/10.1128/JVI.00297-11>.
- [17] S. Olofsson, T. Bergstrom, Glycoconjugate Glycans as Viral Receptors, *Ann Med*, Vol. 37, No. 3, 2005, pp. 154-172, <https://doi.org/10.1080/07853890510007340>.
- [18] C. W. Tan, C. L. Poh, I. C. Sam, Y. F. Chan, Enterovirus 71 Uses Cell Surface Heparan Sulfate Glycosaminoglycan as an Attachment Receptor, *J. Virol*, Vol. 87, No. 1, 2013, pp. 611-620, <https://doi.org/10.1128/JVI.02226-12>.
- [19] X. Song, H. Yu, X. Chen, Y. Lasanajak, M. M. Tappert, G. M. Air, V. K. Tiwari, H. Cao, H. A. Chokhawala, H. Zheng, R. D. Cummings, D. F. Smith, A Sialylated Glycan Microarray Reveals Novel Interactions of Modified Sialic Acids with Proteins and Viruses, *J. Biol Chem*, Vol. 286, No. 36, 2011, pp. 31610-31622, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274217>.
- [20] B. Yang, H. Chuang, K. D. Yang, Sialylated Glycans as Receptor and Inhibitor of Enterovirus 71 Infection to DLD-1 Intestinal Cells, *Virol J*, Vol. 6, 2009, pp. 141, <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-141>.
- [21] P. Y. Su, Y. T. Liu, H. Y. Chang, S. W. Huang, Y. F. Wang, C. K. Yu, J. R. Wang, C. F. Chang, Cell Surface Sialylation Affects Binding of Enterovirus 71 to Rhabdomyosarcoma and Neuroblastoma Cells, *BMC Microbiol*, Vol. 12, 2012, pp. 162, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-162>.
- [22] K. M. Hussain, K. L. Leong, M. M. Ng, J. J. Chu, The Essential Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in the Infectious Entry of Human Enterovirus 71, *J Biol Chem*, Vol. 286, No. 1, 2011, pp. 309-321, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168468>.
- [23] [23]. Y. W. Lin, H. Y. Lin, Y. L. Tsou, E. Chitra, K. N. Hsiao, H. Y. Shao, C. C. Liu, C. Sia, P. Chong, Y. H. Chow, Human SCARB2-Mediated Entry and Endocytosis of EV71, *PLoS One*, Vol. 7, No. 1, 2012, pp. e30507, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030507>.
- [24] H. Y. Lin, Y. T. Yang, S. L. Yu, K. N. Hsiao, C. C. Liu, C. Sia, Y. H. Chow, Caveolar Endocytosis is Required for Human PSGL-1-Mediated Enterovirus 71 Infection, *J. Virol*, Vol. 87, No. 16, 2013, pp. 9064-9076, <https://doi.org/10.1128/JVI.00573-13>.
- [25] L. Pelkmans, A. Helenius, Endocytosis via Caveolae, *Traffic*, Vol. 3, No. 5, 2002, pp. 311-320, <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30501.x>.
- [26] S. Yamayoshi, S. Ohka, K. Fujii, S. Koike, Functional Comparison of SCARB2 and PSGL1 as Receptors for Enterovirus 71, *J Virol*, Vol. 87, No. 6, 2013, pp. 3335-3347, <https://doi.org/10.1128/JVI.02070-12>.
- [27] ViralZone, Clathrin-mediated Endocytosis of Virus by Host, 2021.
- [28] M. Kaksonen, A. Roux, Mechanisms of Clathrin-mediated Endocytosis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 19, No. 5, 2018, pp. 313-326, <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>.
- [29] ViralZone, Caveolin-mediated Endocytosis of Virus by Host, 2021.
- [30] A. L. Kiss, E. Botos, Endocytosis via Caveolae: Alternative Pathway with Distinct Cellular Compartments to Avoid Lysosomal Degradation?, *J. Cell Mol Med*, Vol. 13, No. 7, 2009, pp. 1228-1237, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00754.x>.
- [31] S. Yamayoshi, S. Koike, Identification of a Human SCARB2 Region That is Important for Enterovirus 71 Binding and Infection, *J. Virol*, Vol. 85, No. 10, 2011, pp. 4937-4946, <https://doi.org/10.1128/JVI.02358-10>.
- [32] Y. Zhao, J. Ren, S. P. Parra, E. E. Fry, D. I. Stuart, Lysosome Sorting of Beta-glucocerebrosidase by LIMP-2 is Targeted by the Mannose 6-Phosphate Receptor, *Nat Commun*, Vol. 5, 2014, pp. 4321, <https://doi.org/10.1038/ncomms5321>.
- [33] M. Gromeier, E. Wimmer, A. E. Gorbalenya, Genetics, Pathogenesis and Evolution of Picornaviruses, Origin and Evolution of Viruses, Elsevier, 1999, pp. 287-343.
- [34] E. W. M. Gromeier, A. E. Gorbalenya, Genetics, Pathogenesis and Evolution of Picornaviruses, Origin and Evolution of Viruses, 1999.
- [35] S. R. Thompson, P. Sarnow, Enterovirus 71 Contains a Type I IRES Element That Functions When Eukaryotic Initiation Factor Eif4g is Cleaved, *Virology*, Vol. 315, No. 1, 2003, pp. 259-266, [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00544-0](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00544-0).
- [36] S. de Breyne, Y. Yu, A. Unbehaun, T. V. Pestova, C. U. Hellen, Direct Functional Interaction of Initiation Factor eIF4G with Type 1 Internal Ribosomal Entry Sites, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 106, No. 23, 2009, pp. 9197-9202, <https://doi.org/10.1073/pnas.0900153106>.
- [37] E. V. Pilipenko, E. G. Viktorova, S. T. Guest, V. I. Agol, R. P. Roos, Cell-specific Proteins Regulate Viral RNA Translation and Virus-induced Disease, *EMBO J*, Vol. 20, No. 23, 2001, pp. 6899-6908, <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6899>.

- [38] T. V. P. E. V. Pilipenko, V. G. Kolupaeva, E. V. Khitrina, A. N. Poperechnaya, V. I. Agol, C. U. Hellen, A Cell Cycle-dependent Protein Serves as a Template-specific Translation Initiation Factor, *Genes Dev*, 2004.
- [39] S. Y. Leong, B. K. Ong, J. J. Chu, The Role of Misshapen NCK-related Kinase (MINK), a Novel Ste20 Family Kinase, in the IRES-mediated Protein Translation of Human Enterovirus 71, *PLoS Pathog*, Vol. 11, No. 3, 2015, pp. e1004686, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004686>.
- [40] P. Kafasla, N. Morgner, C. V. Robinson, R. J. Jackson, Polypyrimidine Tract-binding Protein Stimulates the Poliovirus IRES by Modulating eIF4G Binding, *EMBO J*, Vol. 29, No. 21, 2010, pp. 3710-3722, <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.231>.
- [41] J. Yuan, L. Shen, J. Wu, X. Zou, J. Gu, J. Chen, L. Mao, Enterovirus A71 Proteins: Structure and Function, *Front Microbiol*, Vol. 9, 2018, pp. 286, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>.
- [42] J. Y. Lin, T. C. Chen, K. F. Weng, S. C. Chang, L. L. Chen, S. R. Shih, Viral and Host Proteins Involved in Picornavirus Life Cycle, *J. Biomed Sci*, Vol. 16, 2009, pp. 103, <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-103>.
- [43] K. W. Buck, Comparison of the Replication of Positive-stranded RNA Viruses of Plants and Animals, *Advances in Virus Research*, 1996.
- [44] A. Salonen, T. Ahola, L. Kaariainen, Viral RNA Replication in Association with Cellular Membranes, *Curr Top Microbiol Immunol*, Vol. 285, 2005, pp. 139-173, [https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6\\_5](https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6_5).
- [45] A. Schlegel, T. H. Giddings, Jr., M. S. Ladinsky, K. Kirkegaard, Cellular Origin and Ultrastructure of Membranes Induced during Poliovirus Infection, *J. Virol*, Vol. 70, No. 10, 1996, pp. 6576-6588, <https://doi.org/10.1128/JVI.70.10.6576-6588.1996>.
- [46] S. C. Huang, C. L. Chang, P. S. Wang, Y. Tsai, H. S. Liu, Enterovirus 71-induced Autophagy Detected *in vitro* and *in vivo* Promotes Viral Replication, *J. Med Virol*, Vol. 81, No. 7, 2009, pp. 1241-1252, <https://doi.org/10.1002/jmv.21502>.
- [47] O. C. Richards, J. F. Spagnolo, J. M. Lyle, S. E. Vleck, R. D. Kuchta, K. Kirkegaard, Intramolecular and Intermolecular Uridylylation by Poliovirus RNA-dependent RNA Polymerase, *J. Virol*, Vol. 80, No. 15, 2006, pp. 7405-7415, <https://doi.org/10.1128/JVI.02533-05>.
- [48] J. Pelletier, N. Sonenberg, Internal Initiation of Translation of Eukaryotic mRNA Directed by a Sequence Derived from Poliovirus RNA, *Nature*, Vol. 334, No. 6180, 1988, pp. 320-325, <https://doi.org/10.1038/334320a0>.
- [49] A. V. Gamarnik, R. Andino, Switch from Translation to RNA Replication in a Positive-stranded RNA Virus, *Genes Dev*, Vol. 12, No. 15, 1998, pp. 2293-2304, <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2293>.
- [50] H. B. Pathak, J. J. Arnold, P. N. Wiegand, M. R. Hargittai, C. E. Cameron, Picornavirus Genome Replication: Assembly and Organization of the VPg Uridylylation Ribonucleoprotein (Initiation) Complex, *J Biol Chem*, Vol. 282, No. 22, 2007, pp. 16202-16213, <https://doi.org/10.1074/jbc.M610608200>.
- [51] A. V. Paul, E. Rieder, D. W. Kim, J. H. van Boom, E. Wimmer, Identification of an RNA Hairpin in Poliovirus RNA that Serves as the Primary Template in the *in vitro* Uridylylation of VPg, *J. Virol*, Vol. 74, No. 22, 2000, pp. 10359-10370, <https://doi.org/10.1128/jvi.74.22.10359-10370.2000>.
- [52] S. Cordey, D. Gerlach, T. Junier, E. M. Zdobnov, L. Kaiser, C. Tapparel, The Cis-acting Replication Elements Define Human Enterovirus and Rhinovirus Species, *RNA*, Vol. 14, No. 8, 2008, pp. 1568-1578, <https://doi.org/10.1261/rna.1031408>.
- [53] M. J. M. van Ooij, D. A. Vogt, A. Paul, C. Castro, J. Kuijpers, F. J. M. van Kuppeveld, C. E. Cameron, E. Wimmer, R. Andino, W. J. G. Melchers, Structural and Functional Characterization of the Coxsackievirus B3 CRE(2C): Role of CRE(2C) in Negative- and Positive-strand RNA Synthesis, *J Gen Virol*, Vol. 87, No. Pt 1, 2006, pp. 103-113, <https://doi.org/10.1099/vir.0.81297-0>.
- [54] J. Y. Lin, M. L. Li, P. N. Huang, K. Y. Chien, J. T. Horng, S. R. Shih, Heterogeneous Nuclear Ribonuclear Protein K Interacts with the Enterovirus 71 5' Untranslated Region and Participates in Virus Replication, *J. Gen Virol*, Vol. 89, No. 10, 2008, pp. 2540-2549, <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003673-0>.
- [55] W. F. Tang, S. Y. Yang, B. W. Wu, J. R. Jheng, Y. L. Chen, C. H. Shih, K. H. Lin, H. C. Lai, P. Tang, J. T. Horng, Reticulon 3 Binds the 2C Protein of Enterovirus 71 and is Required for Viral Replication, *J. Biol Chem*, Vol. 282, No. 8, 2007, pp. 5888-5898, <https://doi.org/10.1074/jbc.M611145200>.



- [56] L. Yi, J. Lu, H. F. Kung, M. L. He, The Virology and Developments toward Control of Human Enterovirus 71, *Crit Rev Microbiol*, Vol. 37, No. 4, 2011, pp. 313-327, <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.580723>.
- [57] R. L. Kuo, S. H. Kung, Y. Y. Hsu, W. T. Liu, Infection with Enterovirus 71 or Expression of Its 2A Protease Induces Apoptotic Cell Death, *J. Gen Virol*, Vol. 83, No. Pt 6, 2002, pp. 1367-1376, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-6-1367>.
- [58] M. L. Li, J. Y. Lin, B. S. Chen, K. F. Weng, S. R. Shih, J. D. Calderon, B. S. Tolbert, G. Brewer, EV71 3C Protease Induces Apoptosis by Cleavage of hnRNP A1 to Promote apaf-1 Translation, *PLoS One*, Vol. 14, No. 9, 2019, pp. e0221048, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221048>.
- [59] M. P. Taylor, K. Kirkegaard, Potential Subversion of Autophagosomal Pathway by Picornaviruses, *Autophagy*, Vol. 4, No. 3, 2008, pp. 286-289, <https://doi.org/10.4161/auto.5377>.
- [60] J. Wang, Y. Hu, M. Zheng, Enterovirus A71 Antivirals: Past, Present, and Future, *Acta Pharm Sin B*, Vol. 12, No. 4, 2022, pp. 1542-1566, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.017>.
- [61] H. R. Pourianfar, C. L. Poh, J. Fecondo, L. Grollo, In vitro Evaluation of the Antiviral Activity of Heparan Sulfate Mimetic Compounds Against Enterovirus 71, *Virus Res*, Vol. 169, No. 1, 2012, pp. 22-29, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.025>.
- [62] M. Arita, T. Wakita, H. Shimizu, Characterization of Pharmacologically Active Compounds That Inhibit Poliovirus and Enterovirus 71 Infectivity, *J. Gen Virol*, Vol. 89, No. Pt 10, 2008, pp. 2518-2530, <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/002915-0>.
- [63] Y. H. Chiu, Y. L. Chan, L. W. Tsai, T. L. Li, C. J. Wu, Prevention of Human Enterovirus 71 Infection by Kappa Carrageenan, *Antiviral Res*, Vol. 95, No. 2, 2012, pp. 128-134, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.05.009>.
- [64] T. Y. Weng, L. C. Chen, H. W. Shyu, S. H. Chen, J. R. Wang, C. K. Yu, H. Y. Lei, T. M. J. A. R. Yeh, Lactoferrin Inhibits Enterovirus 71 Infection by Binding to VP1 Protein and Host Cells, *Vol. 67, No. 1, 2005, pp. 31-37*.
- [65] N. N. Q. Anh, Đ. T. M. Anh, N. V. Khoa, T. T. B. Phuong, N. T. H. Lan, L. P. K. Nguyen, L. H. T. Duong, H. N. K. Quynh, L. T. Lien, N. T. Y. Nhi, N. T. T. Thao, C. T. B. Van, The Neutralization Efficiency of Chicken Egg Yolk Immunoglobulines (IgY) Against Human Enterovirus Type 71, *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, Vol. 25, No. 5, 2015, pp. 144 (in Vietnamese).
- [66] M. P. Fox, M. J. Otto, M. A. McKinlay, Prevention of Rhinovirus and Poliovirus Uncoating by WIN 51711, a New Antiviral Drug, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 30, No. 1, 1986, pp. 110-116, <https://doi.org/10.1128/AAC.30.1.110>.
- [67] M. A. McKinlay, J. A. Frank, Jr., D. P. Benziger, B. A. Steinberg, Use of WIN 51711 to Prevent Echovirus Type 9-Induced Paralysis in Suckling Mice, *J. Infect Dis*, Vol. 154, No. 4, 1986, pp. 676-681, <https://doi.org/10.1093/infdis/154.4.676>.
- [68] D. M. See, J. G. Tilles, Treatment of Coxsackievirus A9 Myocarditis in Mice with WIN 54954, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 36, No. 2, 1992, pp. 425-428, <https://doi.org/10.1128/AAC.36.2.425>.
- [69] T. C. Chen, S. C. Liu, P. N. Huang, H. Y. Chang, J. H. Chern, S. R. Shih, Antiviral Activity of Pyridyl Imidazolidinones Against Enterovirus 71 Variants, *J Biomed Sci*, Vol. 15, No. 3, 2008, pp. 291-300, <https://doi.org/10.1007/s11373-007-9228-5>.
- [70] J. Y. Ho, J. H. Chern, C. F. Hsieh, S. T. Liu, C. J. Liu, Y. S. Wang, T. W. Kuo, S. J. Hsu, T. K. Yeh, S. R. J. J. O. A. C. Shih, In vitro and in vivo Studies of a Potent Capsid-binding Inhibitor of Enterovirus 71, *Vol. 71, No. 7, 2016, pp. 1922-1932*.
- [71] K. X. Wu, M. M. Ng, J. J. Chu, Developments Towards Antiviral Therapies Against Enterovirus 71, *Drug Discov Today*, Vol. 15, No. 23-24, 2010, pp. 1041-1051, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.10.008>.
- [72] R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, RNA Therapeutics: Beyond RNA Interference and Antisense Oligonucleotides, *Nat Rev Drug Discov*, Vol. 11, No. 2, 2012, pp. 125-140, <https://doi.org/10.1038/nrd3625>.
- [73] J. X. Deng, X. J. Nie, Y. F. Lei, C. F. Ma, D. L. Xu, B. Li, Z. K. Xu, G. C. Zhang, The Highly Conserved 5' Untranslated Region as an Effective Target Towards the Inhibition of Enterovirus 71 Replication by Unmodified and Appropriate 2'-Modified siRNAs, *J Biomed Sci*, Vol. 19, 2012, pp. 73, <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-73>.
- [74] Z. Wu, F. Yang, R. Zhao, L. Zhao, D. Guo, Q. Jin, Identification of Small Interfering RNAs Which Inhibit the Replication of Several Enterovirus 71 Strains in China, *J Virol Methods*, Vol. 159, No. 2, 2009, pp. 233-238, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.002>.
- [75] A. C. Sim, A. Luhur, T. M. Tan, V. T. Chow, C. L. Poh, RNA Interference Against Enterovirus

- 71 Infection, *Virology*, Vol. 341, No. 1, 2005, pp. 72-79,  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.047>.
- [76] E. L. Tan, T. M. Tan, V. Tak Kwong Chow, C. L. Poh, Inhibition of Enterovirus 71 in Virus-infected Mice by RNA Interference, *Mol Ther*, Vol. 15, No. 11, 2007, pp. 1931-1938,  
<https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300287>.
- [77] W. W. Lu, Y. Y. Hsu, J. Y. Yang, S. H. Kung, Selective Inhibition of Enterovirus 71 Replication by Short Hairpin RNAs, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 325, No. 2, 2004, pp. 494-499,  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.062>.
- [78] Y. J. Lin, C. C. Lai, C. H. Lai, S. C. Sue, C. W. Lin, C. H. Hung, T. H. Lin, W. Y. Hsu, S. M. Huang, Y. L. Hung, N. Tien, X. Liu, C. L. Chen, F. J. Tsai, Inhibition of Enterovirus 71 Infections and Viral IRES Activity by Fructus Gardeniae and Geniposide, *Eur J Med Chem*, Vol. 62, 2013, pp. 206-213,  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.038>.
- [79] F. J. Tsai, C. W. Lin, C. C. Lai, Y. C. Lan, C. H. Lai, C. H. Hung, K. C. Hsueh, T. H. Lin, H. C. Chang, L. Wan, J. J. Sheu, Y. J. Lin, Kaempferol Inhibits Enterovirus 71 Replication and Internal Ribosome Entry Site (IRES) Activity through FUBP and HNRP Proteins, *Food Chem*, Vol. 128, No. 2, 2011, pp. 312-322,  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.022>.
- [80] C. E. Hoffmann, E. M. Neumayer, R. F. Haff, R. A. Goldsby, Mode of Action of the Antiviral Activity of Amantadine in Tissue Culture, *J. Bacteriol*, Vol. 90, No. 3, 1965, pp. 623-628,  
<https://doi.org/10.1128/jb.90.3.623-628.1965>.
- [81] A. K. Patick, Rhinovirus Chemotherapy, *Antiviral Res*, Vol. 71, No. 2-3, 2006, pp. 391-396,  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.03.011>.
- [82] S. L. Binford, P. T. Weady, F. Maldonado, M. A. Brothers, D. A. Matthews, A. K. Patick, In vitro Resistance Study of Rupintrivir, a Novel Inhibitor of Human Rhinovirus 3 C Protease, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 51, No. 12, 2007, pp. 4366-4373,  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00905-07>.
- [83] Y. J. Lin, Y. C. Chang, N. W. Hsiao, J. L. Hsieh, C. Y. Wang, S. H. Kung, F. J. Tsai, Y. C. Lan, C. W. Lin, Fisetin and Rutin as 3C Protease Inhibitors of Enterovirus A71, *J Virol Methods*, Vol. 182, No. 1-2, 2012, pp. 93-98,  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.03.020>.
- [84] N. Falah, R. Montserret, V. Lelogeais, I. Schuffenecker, B. Lina, J. C. Cortay, S. Violot, Blocking Human Enterovirus 71 Replication by Targeting Viral 2A Protease, *J Antimicrob Chemother*, Vol. 67, No. 12, 2012, pp. 2865-2869,  
<https://doi.org/10.1093/jac/dks304>.
- [85] J. D. Graci, K. Too, E. D. Smidansky, J. P. Edathil, E. W. Barr, D. A. Harki, J. E. Galarraga, J. M. Bollinger, Jr., B. R. Peterson, D. Loakes, D. M. Brown, C. E. Cameron, Lethal Mutagenesis of Picornaviruses with N-6-Modified Purine Nucleoside Analogues, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 52, No. 3, 2008, pp. 971-979,  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01056-07>.
- [86] S. Crotty, R. Andino, Implications of High RNA Virus Mutation Rates: Lethal Mutagenesis and the Antiviral Drug Ribavirin, *Microbes and Infection*, Vol. 4, No. 13, 2002, pp. 1301-1307,  
[https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)00008-4](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)00008-4).
- [87] Z. H. Li, C. M. Li, P. Ling, F. H. Shen, S. H. Chen, C. C. Liu, C. K. Yu, S. H. Chen, Ribavirin Reduces Mortality in Enterovirus 71-infected Mice by Decreasing Viral Replication, *J. Infect Dis*, Vol. 197, No. 6, 2008, pp. 854-857,  
<https://doi.org/10.1086/527326>.
- [88] T. C. Chen, H. Y. Chang, P. F. Lin, J. H. Chern, J. T. Hsu, C. Y. Chang, S. R. Shih, Novel Antiviral Agent DTriP-22 Targets RNA-dependent RNA Polymerase of Enterovirus 71, *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 53, No. 7, 2009, pp. 2740-2747,  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00101-09>.
- [89] Q. C. Zhu, Y. Wang, Y. P. Liu, R. Q. Zhang, X. Li, W. H. Su, F. Long, X. D. Luo, T. Peng, Inhibition of Enterovirus 71 Replication by Chrysofenetin and Penduletin, *Eur J Pharm Sci*, Vol. 44, No. 3, 2011, pp. 392-398,  
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.08.030>.
- [90] W. Dai, Y. Wu, J. Bi, X. Lu, A. Hou, Y. Zhou, B. Sun, W. Kong, J. Barbier, J. C. J. A. R. Cintrat, Antiviral Effects of Retro-2cycl and Retro-2.1 Against Enterovirus 71 in vitro and in vivo, *Vol. 144, No.*, 2017, pp. 311-321.
- [91] H. Y. Ho, M. L. Cheng, S. F. Weng, L. Chang, T. T. Yeh, S. R. Shih, D. T. Chiu, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Enhances Enterovirus 71 Infection, *J Gen Virol*, Vol. 89, No. Pt 9, 2008, pp. 2080-2089,  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001404-0>.
- [92] H. Y. Ho, M. L. Cheng, S. F. Weng, Y. L. Leu, D. T. Chiu, Antiviral Effect of Epigallocatechin Gallate on Enterovirus 71, *J Agric Food Chem*, Vol. 57, No. 14, 2009, pp. 6140-6147,  
<https://doi.org/10.1021/jf901128u>.
- [93] M. L. Liu, Y. P. Lee, Y. F. Wang, H. Y. Lei, C. C. Liu, S. M. Wang, I. J. Su, J. R. Wang, T. M. Yeh, S. H. Chen, C. K. Yu, Type I Interferons Protect

- Mice against Enterovirus 71 Infection, *J. Gen Virol*, Vol. 86, No. Pt 12, 2005, pp. 3263-3269, <https://doi.org/10.1099/vir.0.81195-0>.
- [94] B. Wang, X. Xi, X. Lei, X. Zhang, S. Cui, J. Wang, Q. Jin, Z. Zhao, Enterovirus 71 Protease 2Apro Targets MAVS to Inhibit Anti-Viral Type I Interferon Responses, *PLoS Pathog*, Vol. 9, No. 3, 2013, pp. e1003231, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003231>.
- [95] C. W. Lin, C. F. Wu, N. W. Hsiao, C. Y. Chang, S. W. Li, L. Wan, Y. J. Lin, W. Y. Lin, Aloe-emodin is an Interferon-inducing Agent with Antiviral Activity Against Japanese Encephalitis Virus and Enterovirus 71, *Int J Antimicrob Agents*, Vol. 32, No. 4, 2008, pp. 355-359, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.04.018>.
- [96] S. R. Shih, K. F. Weng, V. Stollar, M. L. Li, Viral Protein Synthesis is Required for Enterovirus 71 to Induce Apoptosis in Human Glioblastoma Cells, *J. Neurovirol*, Vol. 14, No. 1, 2008, pp. 53-61, <https://doi.org/10.1080/13550280701798980>.
- [97] C. Kim, H. Kang, D. E. Kim, J. H. Song, M. Choi, M. Kang, K. Lee, H. S. Kim, J. S. Shin, H. J. V. J. Jeong, Antiviral Activity of Micafungin Against Enterovirus 71, Vol. 13, No. 1, 2016, pp. 1-9.
- [98] S. R. Shih, K. N. Tsai, Y. S. Li, C. C. Chueh, E. C. Chan, Inhibition of Enterovirus 71-Induced Apoptosis by Allophycocyanin Isolated from a Blue-green Alga *Spirulina Platensis*, *J. Med Virol*, Vol. 70, No. 1, 2003, pp. 119-125, <https://doi.org/10.1002/jmv.10363>.
- [99] N. T. T. Thao, D. T. H. Tuoi, N. P. Dung, Antibacterial and Antiviral EV71 Activity of Preparation from Betel Leaves Extract (*Piper Betel* L.), *Ho Chi Minh Journal of Medical*, Vol. 19, No. 5, 2015, pp. 118 (in Vietnamese).
- [100] M. Wang, S. Jiang, Y. Wang, Recombinant VP1 Protein Expressed in *Pichia Pastoris* Induces Protective Immune Responses Against EV71 in Mice, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 430, No. 1, 2013, pp. 387-393, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.035>.
- [101] N. D. Lam, C. T. B. Van, Construction of the Vector Expressed VP1 Gene of Enterovirus 71, *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, Vol. 25, No. 5, 2015, pp. 149 (in Vietnamese).
- [102] T. B. Hanh, L. T. Luan, N. P. Yen, N. P. Thao, N. T. T. Thao, Initial Developing a Vaccine Candidate Virus for EV71 in Vero Cell Line, *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, Vol. 23, No. 3, 2013, pp. 43 (in Vietnamese).
- [103] T. M. Hien, N. T. Thuy, P. V. Chung, L. T. Luan, Some Ultrastructural Characteristics of Enterovirus 71 Adaptation in Vero Cell Line, *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, Vol. 25, No. 8, 2015, pp. 233 (in Vietnamese).
- [104] F. Zhu, W. Xu, J. Xia, Z. Liang, Y. Liu, X. Zhang, X. Tan, L. Wang, Q. Mao, J. Wu, Y. Hu, T. Ji, L. Song, Q. Liang, B. Zhang, Q. Gao, J. Li, S. Wang, Y. Hu, S. Gu, J. Zhang, G. Yao, J. Gu, X. Wang, Y. Zhou, C. Chen, M. Zhang, M. Cao, J. Wang, H. Wang, N. Wang, Efficacy, Safety, and Immunogenicity of an Enterovirus 71 Vaccine in China, *N Engl J Med*, Vol. 370, No. 9, 2014, pp. 818-828, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304923>.